

## Zellen und Verfahren zur fermentativen Herstellung von R- $\alpha$ -Liponsäure

Die Erfindung betrifft Zellen und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von R- $\alpha$ -Liponsäure.

R- $\alpha$ -Liponsäure ist in einer Vielzahl von Pro- und Eukaryonten ein essentieller Cofaktor bestimmter Multienzymkomplexe. Dabei ist die R- $\alpha$ -Liponsäure mit seiner Carboxylgruppe unter Bildung eines so genannten Lipoamids jeweils kovalent an die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines spezifischen Lysin-Rests des entsprechenden Enzyms gebunden. Auf diese Weise ist die R- $\alpha$ -Liponsäure ein Teil der E2-Untereinheit der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) [EC 2.3.1.12] bzw. der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase (KGDH) [EC 2.3.1.61] und spielt dort als Redoxpartner und Acylgruppenüberträger eine entscheidende Rolle bei der oxidativen Decarboxylierung von  $\alpha$ -Ketosäuren. Außerdem fungiert R- $\alpha$ -Liponsäure als Aminomethyl-Carrier in Glycin-Cleavage Enzymsystemen.

Die physiologisch und genetisch am besten charakterisierte  $\alpha$ -Ketosäure-Dehydrogenase ist der Pyruvat-Dehydrogenase-Multienzymkomplex von *Escherichia coli*. Die drei Untereinheiten E1 (Pyruvat-Dehydrogenase), E2 (Dihydrolipoamid-Acetyltransferase) und E3 (Dihydrolipoamid-Dehydrogenase) werden von einem Operon bestehend aus den Genen *aceE*, *aceF* und *lpd* codiert und formen einen Multienzymkomplex, welcher sich aus 24 E1-, 24 E2- und 12 E3-Untereinheiten zusammensetzt. Dabei bilden die 24 E2-Untereinheiten das Kernstück des Komplexes. Das E2-Monomer der PDH (E2p) ist wiederum modular aus verschiedenen Domänen aufgebaut, die über flexible Linkerregionen miteinander verbunden sind (s. Fig. 1). Der N-Terminus des Proteins enthält drei so genannte Lipoyl-Domänen bestehend aus jeweils ca. 80 Aminosäureresten, wobei jede dieser Domänen genau ein Molekül R- $\alpha$ -Liponsäure wie oben beschrieben binden kann. Diese drei Lipoyl-Domänen der PDH weisen untereinander jeweils eine sehr hohe Sequenzidentität (> 66 %) auf. An die N-terminale Region des Proteins schließt sich die kleine zentrale E3-Bindedomäne an, die wiederum mit dem C-terminalen Be-

reich, der die katalytischen Domäne (Acetyl-Transferase) enthält, verbunden ist.

Die E2-Untereinheit der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase (E2o) wird vom *sucB*-Gen codiert und ist ebenfalls modular aufgebaut, besitzt aber im Gegensatz zum E2-Protein der PDH nur eine Lipoyl-Domäne. Die Sequenz der E2o-Lipoyl-Domäne zeigt mit nur etwa 22 % eine relativ schwache Identität zu den E2p-Lipoyl-Domänen, die räumliche Struktur der Lipoyl-Domänen beider E2-Proteine ist allerdings sehr ähnlich (Reche und Perham, 1999, EMBO J. 18: 2673-2682).

Ein bezüglich der Sequenz zu den Lipoyl-Domänen der E2-Proteine auch nur mäßig homologes, strukturell aber ebenfalls sehr ähnliches Protein ist die Biotinyl-Domäne des Biotin-Carboxyl-Carrier-Proteins (BCCP). Das BCCP wird normalerweise posttranslational mittels der Biotinyl-Protein-Ligase BirA an einem spezifischen Lysin-Rest biotinyliert. Es gibt allerdings verschiedene spezifisch mutierte BCCP-Varianten, die mittels einer Lipoyl-Protein-Ligase an diesem speziellen Lysin-Rest nun auch alternativ oder sogar ausschließlich lipoyliert werden können (Reche und Perham, 1999, EMBO J. 18: 2673-2682).

$\alpha$ -Liponsäure ist ein optisch aktives Molekül mit einem Chiralitätszentrum am Kohlenstoffatom C6. Dabei stellt die R-Konfiguration der  $\alpha$ -Liponsäure das natürlich vorkommende Enantiomer dar. Nur diese Form zeigt physiologische Aktivität als Cofaktor der entsprechenden Enzyme.  $\alpha$ -Liponsäure kann sowohl in einer oxidierten (5-[1,2]-Dithiolan-3-yl-Pentansäure) als auch in einer reduzierten Form (6,8-Dimercapto-Oktansäure) vorkommen. Im Folgenden sind unter der Bezeichnung " $\alpha$ -Liponsäure" beide Formen sowie die jeweiligen Salze der  $\alpha$ -Liponsäure, wie z. B. das Calcium-, Kalium-, Magnesium-, Natrium- oder das Ammoniumsalz zu verstehen.

Die Biosynthese von R- $\alpha$ -Liponsäure wurde besonders an dem Bakterium *Escherichia coli* intensiv untersucht (s. Fig. 2). Hier dient Oktansäure, die an das Acyl-Carrier-Protein (ACP) kova-

lent gebunden ist, als spezifische Vorstufe bei der Liponsäure-Synthese. In einer komplexen Reaktion werden zwei Schwefelatome auf die derart aktivierte Oktansäure (Oktanoyl-ACP) übertragen, wobei R- $\alpha$ -Lipoyl-ACP entsteht. Diese Reaktion wird von der Liponsäure-Synthase [EC 2.8.1.-], dem *lipA*-Genprodukt, katalysiert. Als Schwefeldonor dient dabei letztendlich die Aminosäure L-Cystein. Der anschließende Transfer der R- $\alpha$ -Liponsäure von R- $\alpha$ -Lipoyl-ACP auf die E2-Untereinheit der  $\alpha$ -Ketosäure-Dehydrogenasen wird von der Lipoyl-Protein-Ligase B [EC 6.-.-.-], dem *lipB*-Genprodukt, katalysiert, ohne dass dabei jedoch R- $\alpha$ -Lipoyl-ACP oder R- $\alpha$ -Liponsäure als freie Zwischenprodukte auftreten (Miller et al., 2000, Biochemistry 39:15166-15178).

*E. coli* kann aber auch freie R- $\alpha$ -Liponsäure aus dem umgebenden Medium aufnehmen und für die Bildung funktioneller  $\alpha$ -Ketosäure-Dehydrogenasen verwenden. Dazu wird R- $\alpha$ -Liponsäure zunächst mittels ATP zu R- $\alpha$ -Lipoyl-AMP aktiviert und anschließend auf die entsprechenden Enzym-Untereinheiten übertragen (s. Fig. 3). Beide Aktivitäten werden von der Lipoyl-Protein-Ligase A [EC 6.-.-.-], dem *lplA*-Genprodukt, katalysiert. Diese LplA-Aktivität ist für Wildtypstämme von *E. coli* allerdings nicht essentiell, wenn die endogene Liponsäure-Synthese und der Transfer der Lipoyl-Gruppe über den LipA/LipB-Weg erfolgt. So wurden beispielsweise *lplA*-Mutanten beschrieben, die keine nachweisbare Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität mehr besitzen, deren Phänotyp aber unter normalen Wachstumsbedingungen nicht von einer Wildtyp-Zelle zu unterscheiden ist (Morris et al., 1995, J. Bacteriol. 177: 1-10).

Über die Biosynthese von R- $\alpha$ -Liponsäure in Eukaryonten ist wenig bekannt. Es wird aber vermutet, dass die R- $\alpha$ -Liponsäure-Synthese sowie der Transfer auf die entsprechenden Enzyme in den Mitochondrien eukaryontischer Zellen auf ähnliche Weise wie in Bakterien erfolgt.

Neben ihrer Relevanz als essentieller Bestandteil von Enzymen mit einer zentralen Rolle im Stoffwechsel, wurde schon früh

- die Bedeutung der  $\alpha$ -Liponsäure für die Pharmakotherapie sowie für die Nahrungsmittelergänzung (Nutraceutical) erkannt:  $\alpha$ -Liponsäure besitzt aufgrund ihrer beiden Thiolgruppen eine ausgeprägte Wirksamkeit als Antioxidans und kann deshalb den
- 5 Organismus vor schädlichen Prozessen, die durch oxidativen Stress induziert werden, schützen. Außerdem ist  $\alpha$ -Dihydroliponsäure, die reduzierte Form der  $\alpha$ -Liponsäure, aufgrund ihrer Eigenschaft als starkes Reduktionsmittel in der Lage, andere oxidierte natürliche Antioxidationsmittel im Körper wie
- 10 Ascorbinsäure oder  $\alpha$ -Tocopherol direkt oder indirekt zu regenerieren oder bei deren Mangel diese auch zu ersetzen. Entsprechend kommt der  $\alpha$ -Liponsäure im Zusammenspiel mit Ascorbinsäure,  $\alpha$ -Tocopherol und Glutathion, dem so genannten "Netzwerk der Antioxidantien", eine zentrale Bedeutung zu.
- 15  $\alpha$ -Liponsäure wird außerdem zur Prävention und Bekämpfung von Diabetes mellitus Typ II und dessen Folgeschäden, wie z. B. Polyneuropathie, Cataract oder Kardiovaskularleiden eingesetzt.
- 20 Die unterschiedliche biologische Aktivität beider Enantiomere der  $\alpha$ -Liponsäure ist derzeit Gegenstand intensiver Untersuchungen, wobei sich allerdings immer mehr herauskristallisiert, dass die Applikation des reinen R-Enantiomers der  $\alpha$ -Liponsäure deutliche Vorteile gegenüber der S-Form aufweist.
- 25 So wurde im *in vitro*-Versuch gezeigt, dass nur die natürliche R- $\alpha$ -Liponsäure zur Bildung funktioneller  $\alpha$ -Ketosäure-Dehydrogenasen führt. Das S-Enantiomer hatte dagegen sogar einen inhibierenden Effekt auf die Stimulierung der Enzymaktivität durch R- $\alpha$ -Liponsäure. Die Reduktion von  $\alpha$ -Liponsäure und damit
- 30 die Regeneration der antioxidativ wirksamen  $\alpha$ -Dihydroliponsäure in den Mitochondrien ist für die Zelle von essentieller Bedeutung. Die mitochondriale NADH-abhängige Lipoamid-Reduktase von Säugern zeigt mit dem R-Enantiomer eine fast 20-fach höhere Aktivität als mit der S-Form. Des weiteren hat R-
- 35  $\alpha$ -Liponsäure verglichen mit dem S-Enantiomer einen deutlich stärkeren Effekt auf die insulin-vermittelte Glucose-Aufnahme und den Glucose-Metabolismus von Skelettmuskelzellen insulin-resistenter Ratten. Im Tierversuch zeigte die R-Form außerdem

einen antiphlogistischen Effekt, während die S-Form eher eine analgetische Wirkung hatte. Um unerwünschte Nebeneffekte zu vermeiden, ist es daher äußerst wünschenswert,  $\alpha$ -Liponsäure jeweils nur in der enantiomerenreinen Form zu applizieren.

5

Derzeit erfolgt die großtechnische Herstellung von  $\alpha$ -Liponsäure ausschließlich mittels chemischer Verfahren, wobei immer das Razemat aus R- und S-Form als Endprodukt gebildet wird (Yadav et al., 1990, J. Sci. Ind. Res. 49: 400-409). Zur Gewinnung von enantiomerenreiner R- $\alpha$ -Liponsäure wurden verschiedene Verfahren entwickelt. Beispielsweise kann das Razemat der  $\alpha$ -Liponsäure oder eines der Syntheseintermediate entweder chemisch mittels chiraler Hilfssubstanzen (Walton et. al, 1954, J. Amer. Chem. Soc. 76: 4748; DE 4137773) oder enzymatisch (Adger et al., 1995, J. Chem. Soc., Chem. Commun.: 1563-1564) aufgespalten werden. In anderen Verfahren unterbleibt die Entstehung eines Razemats aufgrund eines enantioselektiven Syntheseschritts, wobei das neue Chiralitätszentrum entweder chemisch (DE 3629116; DE 19533881; Bringmann et al., 1999, Z. Naturforsch. 54b: 655-661; DE 10036516) oder durch eine stereospezifische Biotransformation mittels Mikroorganismen eingeführt werden kann (Gopalan und Jacobs, 1989, Tetrahedron Lett. 30: 5705-5708; Dasaradhi et al., 1990, J. Chem. Soc., Chem. Commun.: 729-730; DE 10056025). Andere Prozesse wiederum starten die chemische Synthese von enantiomerenreiner  $\alpha$ -Liponsäure mit einem natürlich vorkommenden chiralen Edukt wie z. B. S-Maleinsäure oder D-Mannitol (Brookes und Golding, 1988, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I: 9-12; Rama Rao et al., 1987, Tetrahedron Lett. 28, 2183-2186). Wegen z. T. aufwendiger Syntheseschritte, geringer Ausbeuten und hoher Materialkosten sind alle bekannten Methoden zur Herstellung von enantiomerenreiner R- $\alpha$ -Liponsäure derzeit nicht wirtschaftlich.

15

20

25

30

35

Die großtechnische Herstellung vieler niedermolekularer Naturstoffe, wie z.B. Antibiotika, Vitamine oder Aminosäuren erfolgt heute oftmals mittels eines fermentativen Verfahrens unter Verwendung verschiedener Stämme von Mikroorganismen.

Die Patentanmeldungen am Deutschen Patent- und Markenamt mit den Aktenzeichen 10235270, 10245993 und 10258127 beschreiben verschiedene Zellen, die enantiomerenreine R- $\alpha$ -Liponsäure sekretieren sowie Verfahren, bei denen die Produktion von enantiomerenreiner R- $\alpha$ -Liponsäure ausschließlich in einem Fermentationsprozeß erfolgt. Dabei werden Zellen eingesetzt, die entweder ein Liponsäure-Synthase-Gen bzw. ein Lipoyl-Protein-Ligase B-Gen einzeln oder auch in Kombination überexprimieren oder Zellen, die eine verminderte Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität aufweisen. Die Produktion von enantiomerenreiner R- $\alpha$ -Liponsäure mit Hilfe dieser Zellen erfolgt allerdings in noch sehr beschränktem Ausmaß, so dass diese fermentativen Verfahren derzeit noch nicht mit der chemischen Synthese konkurrieren können.

Nur in seltenen Fällen führt eine einzige genetische Manipulation im Zuge des so genannten "metabolic engineering" eines Wildtypstammes zur Überproduktion der gewünschten Verbindung in ausreichendem Umfang. Vielmehr ist dazu eine Kombination von mehreren gezielten genetischen Manipulationen notwendig, oftmals noch ergänzt durch klassische Mutagenese/Screening-Ansätze.

Entsprechend ist es die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, leistungsfähige Zellen, welche enantiomerenreine R- $\alpha$ -Liponsäure in ein Kulturmedium sekretieren, bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird gelöst durch eine Zelle, die enantiomerenreine R- $\alpha$ -Liponsäure in ein Kulturmedium sekretiert, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine gegenüber einem Wildtyp-Stamm erhöhte Lipoyl-Protein-Ligase B Aktivität besitzt und gleichzeitig eine im Vergleich zu dem Wildtyp-Stamm erhöhte Konzentration eines lipoylierbaren Polypeptids aufweist.

Aus physiologischen und biochemischen Daten geht hervor, dass Liponsäure in Wildtyp-Zellen nahezu ausschließlich in gebundener Form vorkommt, da bereits die Synthese der R- $\alpha$ -Liponsäure vollständig proteingebunden erfolgt (vgl. Fig. 1) (Herbert und

Guest, 1975, Arch. Microbiol. 106: 259-266; Miller et al., 2000, Biochemistry 39:15166-15178). Erstaunlicherweise ist die Verstärkung einer Lipoyl-Protein-Ligase B-Aktivität einer Wildtyp-Zelle ausreichend, damit es zur Ausscheidung von R- $\alpha$ -Liponsäure in das Kulturmedium kommt (DE 10245993). Im Rahmen dieser Erfindung wurde nun völlig überraschend gefunden, dass eine Verstärkung der Lipoyl-Protein-Ligase B-Aktivität kombiniert mit einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration eines lipoylierbaren Polypeptids zu einer deutlich gesteigerten Anhäufung enantiomerenreiner R- $\alpha$ -Liponsäure im Kulturmedium dieser Zellen führt.

In einem *E. coli* Wildtyp-Stamm sind normalerweise alle Lipoyl-Bindestellen der E2-Proteine (spezifische Lysinreste) mit R- $\alpha$ -Liponsäure abgesättigt, d.h. mit Liponsäure modifiziert, (Packman et al., 1991, Biochem. J. 277: 153-158), da die *de novo*-Synthese der R- $\alpha$ -Liponsäure und der anschließende Transfer vom R- $\alpha$ -Lipoyl-ACP auf die entsprechenden Lipoyl-Domänen gut aufeinander abgestimmt sind. Die vermehrte Präsenz eines lipoylierbaren Polypeptids in einer Zelle hat nun verschiedene Konsequenzen:

- Es kommt zur Akkumulation von unmodifizierten, d.h. nicht-lipoylierten Lipoyl-Akzeptorproteinen, da die Liponsäure-Synthese-Kapazität der Zelle nicht mehr für eine vollständige Beladung aller potentiell lipoylierbaren Polypeptide ausreicht (Miles und Guest, 1987, Biochem. J. 245: 869-874; Ali und Guest, 1990, Biochem. J. 271: 139-145).
- Zellen mit einer erhöhten Konzentration von unmodifizierten Lipoyl-Akzeptorproteinen können im Vergleich zu Wildtyp-Zellen extern supplementierte R- $\alpha$ -Liponsäure vermehrt aufnehmen und an Lipoyl-Akzeptorproteine binden (Morris et al., 1995, J. Bacteriol. 177: 1-10).
- Die Exkretion von R- $\alpha$ -Liponsäure wird bei einem Liponsäure-Produktionsstamm drastisch vermindert (siehe Stamm W3110 $\Delta$ lplA pGS331 in Beispiel 3), wahrscheinlich deshalb, weil die *de novo* synthetisierte R- $\alpha$ -Liponsäure nun an die vermehrt zur Verfügung stehenden Lipoyl-Akzeptorproteine fi-

xiert werden kann, wodurch eine Ausscheidung verhindert wird.

Entsprechend dieser Befunde würde der Fachmann a priori vermuten, dass durch eine erhöhte Präsenz eines unmodifizierten lipoylierbaren Polypeptids in der Zelle die Exkretion von R- $\alpha$ -Liponsäure auch bei anderen Liponsäure-Produktionsstämmen, wie z. B. dem Stamm W3110 pBAD-lipB, der eine erhöhte Lipoyl-Protein-Ligase B-Aktivität aufweist (DE 10245993), vermindert wird. Durch die Überexpression des *lipB*-Gens verfügen die erfindungsgemäßen Zellen zwar über eine erhöhte Lipoyl-Protein-Ligase B-Aktivität, aber durch eine gleichzeitige Bereitstellung von unbeladenen lipoylierbaren Polypeptiden wäre ausreichend Substrat für die Lipoyl-Protein-Ligase-Reaktion vorhanden, so dass die gesamte *de novo* gebildete R- $\alpha$ -Liponsäure an diesen Proteinen intrazellulär fixiert werden können sollte. Dennoch wird erstaunlicherweise unter diesen Bedingungen die R- $\alpha$ -Liponsäure vermehrt ausgeschieden.

Unter der Lipoyl-Protein-Ligase B-Aktivität ist im Rahmen dieser Erfindung vorzugsweise die vom *lipB*-Gen codierte Lipoyl-Protein-Ligase-Aktivität einer Zelle zu verstehen, welche eine strikte Präferenz für R- $\alpha$ -Lipoyl-ACP gegenüber freier R- $\alpha$ -Liponsäure als Substrat aufweist (s. Fig. 2).

Unter einer gegenüber einem Wildtyp-Stamm erhöhten Lipoyl-Protein-Ligase B-Aktivität ist im Sinne der vorliegenden Erfindung vorzugsweise zu verstehen, dass diese Aktivität mindestens um den Faktor 2, bevorzugt mindestens um den Faktor 5 gesteigert ist.

Vorzugsweise handelt es sich bei dem *lipB*-Gen um ein Gen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1, das für ein Protein mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 codiert oder um ein Gen codierend für eine funktionelle Variante des *lipB*-Genprodukts mit einer Sequenzidentität zu SEQ ID NO: 2 größer 35 %.



Besonders bevorzugt sind funktionelle Varianten des *lipB*-Genprodukts mit einer Sequenzidentität zu SEQ ID NO: 2 größer 55 %, ganz besonders bevorzugt mit einer Sequenzidentität zu SEQ ID NO: 2 größer 80 %.

5

Unter einer funktionellen Variante des *lipB*-Genprodukts ist im Sinne der vorliegenden Erfindung vorzugsweise ein Protein mit einer Aminosäure-Sequenz zu verstehen, die sich durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz ableitet, wobei die enzymatische Aktivität der durch dieses Gen codierten Lipoyl-Protein-Ligase B erhalten bleibt.

10

Unter einem "lipoylierbaren Polypeptid" sind im Rahmen dieser Erfindung Peptide oder Proteine zu verstehen, an die mindestens ein Molekül R- $\alpha$ -Liponsäure kovalent gebunden werden kann. Dabei erfolgt diese Bindung bevorzugt zwischen der Carboxylgruppe der R- $\alpha$ -Liponsäure und der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysin-Restes des Polypeptids unter Bildung eines so genannten Lipoamids. Die Knüpfung einer solchen Lipoamid-Bindung wird in der Zelle vorzugsweise von einer Lipoyl-Protein-Ligase katalysiert.

15

20

Unter einer im Vergleich zu dem Wildtyp-Stamm erhöhten Konzentration eines lipoylierbaren Polypeptids ist im Sinne der vorliegenden Erfindung vorzugsweise zu verstehen, dass die Menge dieses Polypeptids in einer Zelle mindestens um den Faktor 2, bevorzugt mindestens um den Faktor 5 gesteigert ist.

25

Ein Gen, das für ein lipoylierbares Polypeptid codiert, umfasst vorzugsweise ein DNA-Fragment mit der Sequenz SEQ ID NO: 3, welches für ein Polypeptid mit der Sequenz SEQ ID NO: 4 codiert oder ein DNA-Fragment, das für eine funktionelle Variante dieses Polypeptids mit einer Sequenzidentität zu SEQ ID NO: 4 größer 20 % codiert.

30

35

Besonders bevorzugt sind Gene codierend für Varianten eines lipoylierbaren Polypeptids mit einer Sequenzidentität zu SEQ

ID NO: 4 größer 40 %, ganz besonders bevorzugt sind Gene codierend für Polypeptid-Varianten mit einer Sequenzidentität zu SEQ ID NO: 4 größer 70 %.

5 Als Alternativen für Gene, die für ein lipoylierbares Polypeptid codieren, können auch Allele von Genen eingesetzt werden, die ursprünglich für ein biotinylierbares Polypeptid (z.B. BCCP) codieren, jedoch nach geringfügiger Sequenzvariation nun auch lipoyliert werden können (z.B. BCCP-DASMEP). Ein derarti-  
10 ges Gen umfasst ein DNA-Fragment mit der Sequenz SEQ ID NO: 5, welches für ein Polypeptid mit der Sequenz SEQ ID NO: 6 codiert oder ein DNA-Fragment das für eine funktionelle Variante dieses Polypeptids mit einer Sequenzidentität zu SEQ ID NO: 6 größer 75 % codiert.

15 Unter einer funktionellen Variante eines lipoylierbaren Polypeptids ist im Sinne der vorliegenden Erfindung ein Protein mit einer Aminosäure-Sequenz zu verstehen, die sich durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus den in  
20 SEQ ID NO: 3 oder in SEQ ID NO: 5 dargestellten Sequenzen ableitet, wobei die Eigenschaft der Lipoylierbarkeit durch eine Lipoyl-Protein-Ligase erhalten bleibt.

In der vorliegenden Erfindung beziehen sich alle Werte zur Sequenzidentität von DNA- und Aminosäure-Sequenzen auf Ergebnisse, die mit dem Algorithmus BESTFIT (GCG Wisconsin Package, Genetics Computer Group (GLG) Madison, Wisconsin) erhalten werden.

25 Erfindungsgemäße Zellen, die neben einer verstärkten Lipoyl-Protein-Ligase B-Aktivität eine gegenüber dem Wildtyp erhöhte Konzentration eines lipoylierbaren Polypeptids aufweisen, können mit Standardtechniken der Molekularbiologie erzeugt werden.

35 Verfahren zur Steigerung der Aktivität der Lipoyl-Protein-Ligase B in einer Zelle sind im Stand der Technik bekannt und

beispielsweise in der Patentanmeldung DE 10245993 beschrieben, auf die insoweit ausdrücklich Bezug genommen wird.

Die Erhöhung des Spiegels eines lipoylierbaren Polypeptids in  
5 erfindungsgemäßen Zellen wird beispielsweise durch eine verstärkte Expression eines Gens, das für ein lipoylierbares Polypeptid codiert, erreicht. Dabei kann die Kopienzahl eines solchen Gens in den Zellen erhöht sein und/oder es kann durch geeignete Promotoren die Expression dieses Gens verstärkt  
10 sein.

Unter verstärkter Expression ist dabei vorzugsweise zu verstehen, dass das Gen für ein lipoylierbares Polypeptid im Vergleich zur jeweiligen Wildtyp-Zelle, aus der dieses Gen gewonnen wurde, mindestens um den Faktor 2, bevorzugt mindestens um  
15 den Faktor 5 vermehrt exprimiert wird.

Eine Erhöhung der Kopienzahl des Gens codierend für ein lipoylierbares Polypeptid in Zellen kann mit dem Fachmann bekannten  
20 Methoden vorgenommen werden. So kann zum Beispiel ein solches Gen in Plasmid-Vektoren mit mehrfacher Kopienzahl pro Zelle (für *Escherichia coli* z.B. pUC19, pBR322, pACYC184 oder Derivaten davon) kloniert und in die Zellen eingebracht werden. Alternativ kann ein solches Gen mehrfach in das Chromosom des  
25 Wirtsorganismus integriert werden. Als Integrationsverfahren können die bekannten Systeme mit temperenten Bakteriophagen, integrative Plasmide oder die Integration über homologe Rekombination genutzt werden (z.B. Hamilton et al., 1989, J. Bacteriol. 171: 4617-4622).

30 Bevorzugt ist die Erhöhung der Kopienzahl durch Klonierung eines Gens codierend für ein lipoylierbares Polypeptid in einen Plasmid-Vektor unter Kontrolle eines Promotors. Besonders bevorzugt ist die Erhöhung der Kopienzahl durch Klonierung eines  
35 solchen Gens in Plasmid-Vektoren aus der pUC-Familie oder der pBR322-Familie, wie z. B. ptac85 (Ali und Guest, 1990, Biochem. J. 271: 139-145).

Als Kontrollregion für die Expression eines Gens für ein lipoylierbares Polypeptid kann die natürliche Promotor- und Operatorregion dieses Gens dienen, die verstärkte Expression eines solchen Gens kann jedoch insbesondere auch mittels anderer Promotoren erfolgen. Entsprechende Promotorsysteme wie beispielsweise in *Escherichia coli* der konstitutive Promotor des *gapA*-Gens oder die induzierbaren *lac*-, *tac*-, *trc*-,  $\lambda$ -, *ara*- oder *tet*-Promotoren sind dem Fachmann bekannt (Makrides S. C., 1996, Microbiol. Rev. 60: 512-538). Konstrukte, die ein Gen für ein lipoylierbares Polypeptid unter der Kontrolle eines der oben genannten Promotoren enthalten, können in an sich bekannter Weise auf Plasmiden oder chromosomal verwendet werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthalten erfindungsgemäße Zellen ein Plasmid, das ein Gen für ein lipoylierbares Polypeptid unter der Kontrolle eines Promotors enthält, ausgewählt aus der Gruppe *gapA*-, *lac*-, *tac*-, *trc*-,  $\lambda$ -, *ara*- oder *tet*-Promotor. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform befindet sich ein solches Gen unter der Kontrolle des Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactosid/*lacI*-regulierbaren *tac*-Promotors.

Des weiteren kann eine verstärkte Expression dadurch erreicht werden, dass Translationsstartsignale, wie z. B. die Ribomenbindestelle oder das Startcodon des Gens, in optimierter Sequenz auf dem jeweiligen Konstrukt vorhanden sind oder dass gemäß der „codon usage“ seltene Codons gegen häufiger vorkommende Codons ausgetauscht werden.

Die Klonierung eines Gens, das für ein lipoylierbares Polypeptid codiert, in Plasmid-Vektoren erfolgt beispielsweise durch Amplifikation des Gens mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion unter Einsatz von spezifischen Primern, die das komplette Gen, oder zumindest den Teil des Gens, der für ein lipoylierbares Polypeptid codiert (z.B. die Lipoyl-Domäne eines Proteins), erfassen, und anschließende Ligation mit Vektor-DNA-Fragmenten.

Die Erzeugung eines Gens für ein lipoylierbares Hybridpolypeptids, welches sich z. B. aus Teilen zweier verschiedener Lipoyl-Domänen des E2-Proteins zusammensetzt, sowie dessen Klonierung in einen Plasmid-Vektor, ist mit Standardmethoden der Molekularbiologie möglich und bei Miles und Guest (1987, Biochem. J.245: 869-874) beispielsweise beschrieben.

Als bevorzugte Vektoren für die Klonierung eines Gens codierend für ein lipoylierbares Polypeptid werden Plasmide verwendet, die bereits Promotoren zur verstärkten Expression enthalten, beispielsweise den hitze-induzierbaren  $\lambda P_L P_R$ -Promotor oder den Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactosid/*lacI*-regulierbaren synthetischen tac-Promotor von *Escherichia coli*.

Um eine synchrone Überexpression eines *lipB*-Gens mit einem Gen, das für ein lipoylierbares Polypeptid codiert, zu erreichen, können oben genannte Maßnahmen, die zur Überexpression eines Einzelgens führen, auch miteinander kombiniert werden. So können die beiden relevanten Gene beispielsweise auf verschiedenen Plasmiden enthalten sein und die Expression jeweils unter der Kontrolle verschiedener Promotorsysteme liegen. Es ist aber auch möglich, dass beide Gene als künstliches Operon auf demselben Plasmid liegen und die Expression beider Gene somit synchron durch denselben Promotor reguliert wird. Des weiteren können das *lipB*-Gen und das Gen für ein lipoylierbares Polypeptid auch auf demselben Plasmid lokalisiert sein, wobei jedes Gen von einem eigenen Promotor reguliert wird. Dabei können die beiden Promotoren entweder demselben oder aber einem unterschiedlichen Typ angehören.

Plasmide, die sowohl ein *lipB*-Gen als auch ein Gen für ein lipoylierbares Polypeptid enthalten, sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

In einer bevorzugten Ausführungsform befinden sich die beiden Gene auf demselben Plasmid jeweils unter der Kontrolle eines eigenen Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactosid/*lacI*-regulierbaren tac-Promotors.

Die Erfindung betrifft somit auch ein Plasmid, das dadurch gekennzeichnet ist, dass es ein *lipB*-Gen sowie ein Gen, das für ein lipoylierbares Polypeptid codiert, jeweils unter Kontrolle eines Promotors trägt.

Durch eine gängige Transformationsmethode (z.B. Elektroporation) werden die Plasmide, die ein *lipB*-Gen und/oder ein Gen für ein lipoylierbares Polypeptid enthalten, in eine Ausgangszelle eingebracht und beispielsweise mittels Antibiotika-Resistenz auf plasmid-tragende Klone selektiert.

Die Erfindung betrifft somit auch ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Zelle, dadurch gekennzeichnet, dass in eine Ausgangszelle ein Plasmid, das ein *lipB*-Gen und ein Plasmid, das ein Gen für ein lipoylierbares Polypeptid enthält oder ein erfindungsgemäßes Plasmid eingebracht werden.

In einer Vielzahl von pro- und eukaryontischen Zellen bzw. Organismen konnten Gene, die für lipoylierbare Polypeptide codieren (z. B. *aceF*, *sucB*) sowie Gene, die für die *de novo*-Synthese von R- $\alpha$ -Liponsäure benötigt werden (z. B. *lipA*, *lipB*), identifiziert werden. Erfindungsgemäße Zellen lassen sich somit vorzugsweise aus Zellen von pro- oder eukaryontischen Organismen herstellen, die in der Lage sind, R- $\alpha$ -Liponsäure selbst zu synthetisieren (Ausgangszelle), die rekombinanten Verfahren zugänglich sind und die durch Fermentation kultivierbar sind. Auch pflanzliche oder tierische Zellen, die in Zellkultur züchtbar sind, sind somit zur Herstellung erfindungsgemäßer Zellen geeignet.

Zur Herstellung erfindungsgemäßer Zellen können solche Ausgangszellen verwendet werden, die bisher noch keinerlei Manipulation unterzogen wurden. Des weiteren ist es jedoch möglich, die erfindungsgemäßen Zellen auch mit Maßnahmen zu kombinieren, die bereits zu einer verbesserten Produktion von R- $\alpha$ -Liponsäure führen. So sind beispielsweise solche Zellen besonders geeignet, die durch eine verstärkte Expression des *li-*

pA-Gens bereits über eine erhöhte Liponsäure-Synthase-Aktivität verfügen und/oder nur noch eine abgeschwächte, vorzugsweise völlig ausgeschaltete Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität aufweisen. Verfahren zur Herstellung von Zellen mit einer verstärkten Liponsäure-Synthase-Aktivität und/oder einer abgeschwächten Lipoyl-Protein-Ligase A-Aktivität sind in den Patentanmeldungen DE 10235270 und DE 10258127 beschrieben.

Bevorzugt handelt es sich bei den Zellen um Mikroorganismen, wie zum Beispiel Hefe- oder Bakterienstämme. Besonders bevorzugt handelt es sich um Bakterienstämme aus der Familie der Enterobacteriaceae, ganz besonders bevorzugt um Stämme der Art *Escherichia coli*.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von enantiomerenreiner R- $\alpha$ -Liponsäure. Dieses Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass eine erfindungsgemäße Zelle in einem Kulturmedium kultiviert wird, wobei die Zelle enantiomerenreine R- $\alpha$ -Liponsäure in das Kulturmedium ausscheidet und die enantiomerenreine R- $\alpha$ -Liponsäure vom Kulturmedium abgetrennt wird.

Die Ausscheidung von R- $\alpha$ -Liponsäure aus den erfindungsgemäßen Zellen in das Kulturmedium erlaubt eine einfache Isolierung des Produkts aus dem Kulturmedium nach Abtrennung der Biomasse, ohne dass die Zellen zuvor aufgebrochen werden müssen, bzw. ohne dass die R- $\alpha$ -Liponsäure durch einen aufwendigen und verlustreichen Hydrolyseschritt vom daran gebundenen Trägerprotein (ACP oder die E2-Untereinheit der  $\alpha$ -Ketosäure-Dehydrogenasen) abgespalten werden muss. Die Gewinnung von R- $\alpha$ -Liponsäure aus dem Kulturmedium kann nach dem Fachmann bekannten Verfahren, wie beispielsweise Zentrifugation des zellhaltigen Kulturmediums zur Abtrennung der Zellen und durch anschließende Extraktion und/oder Präzipitation des Produkts erfolgen.

Die Kultivierung der erfindungsgemäßen Zellen zur Produktion von R- $\alpha$ -Liponsäure erfolgt in gängigen Kulturmedien, vorzugs-

weise in einem aus der Literatur bekannten Minimalsalzmedium (Herbert und Guest, 1970, Meth. Enzymol. 18A, 269-272).

Als Kohlenstoffquelle können prinzipiell alle verwertbaren Zucker, Zuckeralkohole oder organische Säuren bzw. deren Salze verwendet werden. Dabei werden bevorzugt Asparaginsäure, Äpfelsäure, Bernsteinsäure, Brenztraubensäure, Fumarsäure, Glutaminsäure, Glucose, Glycerin oder Oxalessigsäure eingesetzt. Besonders bevorzugt sind Bernsteinsäure und Oxalessigsäure.

Auch ist eine kombinierte Fütterung mehrerer verschiedener Kohlenstoffquellen möglich. Des weiteren können kurzkettige Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C2-C8, bevorzugt mit einer Kettenlänge von C6-C8 (Hexan- bzw. Oktansäure) als spezifische Vorstufen für die  $\alpha$ -Liponsäure-Synthese dem Medium zugesetzt werden. Dabei beträgt die Konzentration der zugesetzten Kohlenstoffquelle vorzugsweise 0,1-30 g/l.

Die Inkubation der erfindungsgemäßen Zellen erfolgt vorzugsweise unter aeroben Kultivierungsbedingungen über einen Zeitraum von 16 - 150 h und im Bereich der für die jeweiligen Zellen optimalen Wachstumstemperatur.

Als optimaler Temperaturbereich werden 15 - 55 °C bevorzugt. Besonders bevorzugt ist eine Temperatur zwischen 30 und 37 °C.

Der Nachweis und die Quantifizierung der im erfindungsgemäßen Verfahren produzierten R- $\alpha$ -Liponsäure erfolgt beispielsweise mittels eines Bioassays unter Verwendung eines liponsäureauxotrophen Indikatorstammes (*lipA*-Mutante). Diese Art der turbidimetrischen Quantifizierung von R- $\alpha$ -Liponsäure ist aus der Literatur bekannt (Herbert und Guest, 1970, Meth. Enzymol. 18A, 269-272). Der im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendete Indikatorstamm W1485lip2 (ATCC 25645), würde allerdings auch ohne supplementierte R- $\alpha$ -Liponsäure wachsen, wenn das Medium neben Glucose auch noch Acetat und Succinat enthält. Um ein falschpositives Wachstum des Indikatorstammes im Bioassay bei der Bestimmung der produzierten R- $\alpha$ -Liponsäure zu vermeiden - beispielsweise verursacht durch einen Eintrag von



Glucose und den vom Produktionsstamm zusätzlich zur R- $\alpha$ -Liponsäure ausgeschiedenen Säuren Acetat und Succinat - erfolgt bereits die Anzucht des R- $\alpha$ -Liponsäure-Produzenten bevorzugt mit Succinat als einziger Kohlenstoffquelle. Dieser Stamm wird mit  
5 dem Kulturüberstand einer erfindungsgemäßen Zellanzucht supplementiert; anhand des Wachstums des Indikatorstammes kann dann der Liponsäure-Gehalt im Kulturmedium bestimmt werden.

Die folgenden Beispiele dienen der weiteren Erläuterung der  
10 Erfindung. Der Bakterienstamm *Escherichia coli* W3110/pKP560/pGS331, der für die Ausführung der Beispiele verwendet wurde, wurde bei der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38142 Braunschweig) unter der Nummer DSM 15661 gemäß Budapester Vertrag hinterlegt.  
15 Der Stamm W3110 $\Delta$ lplA, eine Deletionsmutante im *lplA*-Gen, welches für die Lipoyl-Protein-Ligase A codiert, ist in der Patentanmeldung DE 10258127 des gleichen Anmelders beschrieben. Das Plasmid pACYC184 ist bei Chang und Cohen (1978, J. Bacteriol. 134: 1141-1156), das *lipB*-Expressionsplasmid pBAD-lipB  
20 ist in der Patentanmeldung DE 10245993 beschrieben. Für die Expression des Gens, das für ein lipoylierbares Polypeptid codiert, wurde das Plasmid pGS331 verwendet (Ali et al., 1990, Biochem. J. 271: 139-145). Dieses Plasmid enthält neben dem Ampicillin-Resistenzgen ein subgenes Fragment des  
25 *aceF*-(E2p)-Gens von *Escherichia coli*, welches für eine Lipoyl-Domäne codiert und das sich unter der Expressionskontrolle des *tac*-Promotors befindet. Das Gen für diese Lipoyl-Domäne ist in diesem Fall ein Hybrid, zusammengesetzt aus den Codons für die Aminosäurereste 1-33 der ersten Lipoyl-Domäne und den Resten  
30 238-289 der dritten Lipoyl-Domäne des E2p-Proteins.

#### **Beispiel 1: Konstruktion des *lipB*-Expressionsplasmids pKP560**

Der Plasmidvektor pACYC184 wurde zunächst mit der Restriktionseendonuklease *Ava*I unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen geschnitten. Die dabei erzeugten 5'-überhängenden Enden  
35 des restringierten Vektors wurden nach Herstellerangaben mittels der Klenow-Polymerase aufgefüllt, der Vektor anschließend mit der Restriktionseendonuklease *Cla*I geschnitten und danach

durch Behandlung mit Alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Der gesamte Restriktionsansatz wurde dann in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Das 2,8 kb lange DNA-Fragment, das neben dem Replikationsursprung p15A auch noch das Chloramphenicol-Resistenzgen enthält, wurde anschließend mittels des QIAquick Gel Extraktion Kits (Qiagen GmbH, Hilden) nach Herstellerangaben aus dem Agarosegel isoliert und gereinigt. Das *lipB*-Gen unter Kontrolle des arabinose-induzierbaren *araBAD*-Promotors (pBAD) wurde aus dem Plasmid pBAD-*lipB* gewonnen, welches zunächst mit der Restriktionsendonuklease *Xba*I unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen geschnitten wurde. Die dabei erzeugten 5'-überhängenden Enden des restringierten Vektors wurden dann nach Herstellerangaben mittels der Klenow-Polymerase aufgefüllt und der Vektor wurde anschließend mit der Restriktionsendonuklease *Cla*I geschnitten. Der gesamte Restriktionsansatz wurde dann in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Das 2 kb lange DNA-Fragment, das die Regulationssequenzen des Arabinose-Operons von *E. coli* (*araC*-Gen, *araBAD*-Promotorregion) und außerdem das *lipB*-Gen unter der Kontrolle des *araBAD*-Promotors enthält, wurde anschließend wie für das Vektorfragment von pACYC184 beschrieben aus dem Agarosegel isoliert und gereinigt. Die Ligation des *araC*-pBAD-*lipB*-Fragments mit dem 2,8 kb langen Vektorfragment von pACYC184 erfolgte mittels der T4-DNA-Ligase. Die Transformation von *E. coli*-Zellen des Stammes DH5 $\alpha$  mit dem Ligationsansatz erfolgte durch Elektroporation in einer dem Fachmann bekannten Art und Weise. Der Transformationsansatz wurde dann auf LB-Chloramphenicol-Agarplatten (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 15 g/l Agar, 20 mg/l Chloramphenicol) ausgebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die gewünschten Transformanten wurden nach einer Plasmidisolierung mittels des GFX<sup>TM</sup> Micro Plasmid Prep Kits (Amersham Biosciences GmbH, Freiburg) durch eine Restriktionsanalyse identifiziert. Der so erhaltene Vektor trägt die Bezeichnung pKP560 (Fig. 4).

## Beispiel 2: Herstellung von R- $\alpha$ -Liponsäure-Produzenten

Das *lipB*-Überexpressionsplasmid pKP560 bzw. das Lipoyl-Domänen-Plasmid pGS331 wurden mittels Elektroporation in die *E. coli*-Stämme W3110 bzw. W3110 $\Delta$ *lp1A* transformiert und nach Selektion auf LB-Agarplatten mit 20 mg/l Chloramphenicol bzw. 100 mg/l Ampicillin wurden die Plasmide aus jeweils einer der Transformanten reisoliert, mit Restriktionsendonukleasen gespalten und überprüft. Mit dem Kontrollplasmid pACYC184 wurde in analoger Weise verfahren.

Für die gemeinsame Überexpression des *lipB*-Gens mit dem Lipoyl-Domänen-Gen wurden die Stämme W3110 pKP560 bzw. W3110 $\Delta$ *lp1A* pKP560 mit dem Plasmid pGS331 wie oben beschrieben transformiert und die erhaltenen Transformanten mittels Restriktionsanalyse überprüft.

### 15 Beispiel 3: Fermentative Produktion von R- $\alpha$ -Liponsäure

Für die fermentative Produktion von R- $\alpha$ -Liponsäure wurden die in Beispiel 2 durch Transformation mit den entsprechenden Plasmiden erzeugten Stämme verwendet. Als Vorkultur für die Produktionsanzucht wurden zunächst 5 ml LB-Flüssigmedium, das zur Stabilisierung von Plasmiden 100 mg/l Ampicillin und/oder 20 mg/l Chloramphenicol enthielt, mit dem jeweiligen Stamm beimpft und für 16 h bei 37 °C und 160 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und zweimal mit dem entsprechenden Volumen steriler Saline (0,9 % NaCl) gewaschen. Mit den auf diese Weise vorbereiteten Zellen wurden schließlich 15 ml BS-Medium (7 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 3 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,1 g/l MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O; 0,5 g/l Na<sub>3</sub>Citrat x 3 H<sub>2</sub>O; 1% säurehydrolysiertes Casein (vitaminfrei); 13,5 g/l Na<sub>2</sub>Succinat x 6 H<sub>2</sub>O; pH 6,8 mit HCl eingestellt), das außerdem 100 mg/l Ampicillin und/oder 20 mg/l Chloramphenicol enthielt, im Verhältnis 1:100 angeimpft. Die Inkubation der Produktionskulturen erfolgte bei 37 °C und 160 rpm auf einem Schüttler. Die Expression des Lipoyl-Protein-Ligase B-Gens in den Stämmen, die das Plasmid pKP560 enthielten, wurde durch Zugabe von 2 g/l L-Arabinose nach ca. 4 h Inkubation induziert. Zum gleichen Zeitpunkt wurde auch die Expression der E2-Domäne in den Stämmen mit dem Plasmid pGS331 durch Zugabe von 0,05 g/l Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactosid indu-

- ziert. Nach 24 h Inkubation wurden Proben entnommen und die Zellen durch Zentrifugation vom Kulturmedium abgetrennt. Die darin enthaltene R- $\alpha$ -Liponsäure wurde mittels des bekannten turbidimetrischen Bioassays (Herbert und Guest, 1970, Meth. Enzymol. 18A: 269-272) quantifiziert. Tabelle 1 zeigt die er-
- 5 zielteten Gehalte von R- $\alpha$ -Liponsäure im jeweiligen Kulturüberstand nach 24 h Inkubation:

Tabelle 1:

10

Stamm	R- $\alpha$ -Liponsäure [ $\mu$ g/l]
W3110 pACYC184	0
W3110 pKP560	20
W3110 pKP560 pGS331	50
W3110 pGS331	0
W3110 $\Delta$ lp1A pACYC184	23
W3110 $\Delta$ lp1A pKP560	119
W3110 $\Delta$ lp1A pKP560 pGS331	220
W3110 $\Delta$ lp1A pGS331	2

## INTERNATIONAL FORM

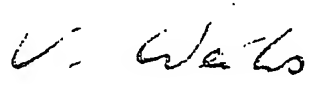
Consortium für elektrochem.

Industrie GmbH

Zielstattstr. 20-22

81379 München

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT  
issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: W3110/pKP560/pGS331	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:  DSM 15661
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
<p>The microorganism identified under I. above was accompanied by:</p> <p>( X ) a scientific description ( X ) a proposed taxonomic designation</p> <p>(Mark with a cross where applicable).</p>	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2003-06-06 (Date of the original deposit) <sup>1</sup> .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
<p>The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).</p>	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH  Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):    Date: 2003-06-10

<sup>1</sup> Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

0-1	Formular PCT/RO/134 (SAFE) Angaben zu einem hinterlegten Mikroorganismus und/oder anderem hinterlegten biologischen Material	
0-1-1	erstellt durch Benutzung von	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.162)
0-2	Internationales Aktenzeichen	PCT/EP200 4 / 0 0 7 4 8 7
0-3	Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	Co 10314
1	Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus und/ oder anderes biologisches Material, der/das in der Beschreibung genannt ist	
1-1	Seite	17
1-2	Zeile	10-14
1-3	Angaben betr. Hinterlegung	
1-3-1	Name der Hinterlegungsstelle	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroor- ganismen und Zellkulturen GmbH
1-3-2	Anschrift der Hinterlegungsstelle	Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany
1-3-3	Datum der Hinterlegung	06. Juni 2003 (06.06.2003)
1-3-4	Eingangsnummer	DSMZ 15661
1-5	Bestimmungsstaaten, für die besondere Angaben gemacht werden	alle Bestimmungsstaaten

## VOM ANMELDEAMT AUSZUFÜLLEN

0-4	Dieses Formular ist mit der interna- tionalen Anmeldung eingegangen (ja oder nein)	Ja
0-4-1	Bevollmächtigter Bediensteter	u.d. Krug +

## VOM INTERNATIONALEN BÜRO AUSZUFÜLLEN

0-5	Dieses Formular ist an folgendem Datum beim internationalen Büro eingegangen	
0-5-1	Bevollmächtigter Bediensteter	

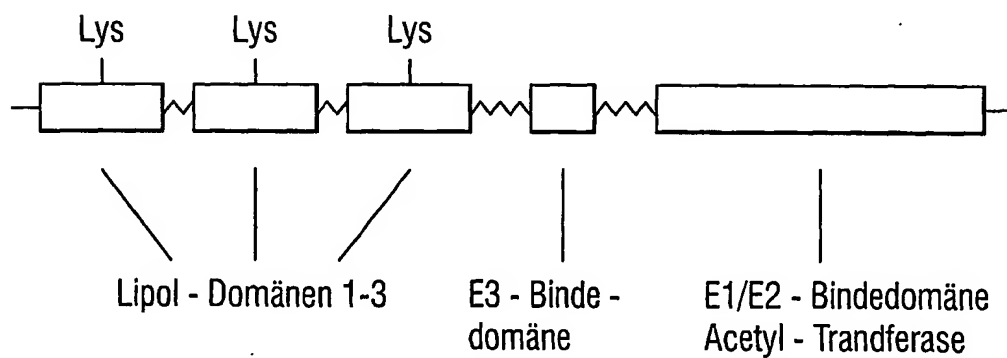
### Patentansprüche

1. Zelle, die enantiomerenreine R- $\alpha$ -Liponsäure in ein Kulturmedium sekretiert, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine gegenüber einem Wildtyp-Stamm erhöhte Lipoyl-Protein-Ligase B Aktivität besitzt und gleichzeitig eine im Vergleich zu dem Wildtyp-Stamm erhöhte Konzentration eines lipoylierbaren Polypeptids aufweist.  
5
2. Zelle nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um einen Mikroorganismus, wie zum Beispiel einen Hefe- oder Bakterienstamm handelt.  
10
3. Zelle nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um einen Bakterienstamm aus der Familie der Enterobacteriaceae, bevorzugt um einen Stamm der Art *Escherichia coli* handelt.  
15
4. Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Lipoyl-Protein-Ligase B-Aktivität mindestens um den Faktor 2 gesteigert ist.  
20
5. Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration des lipoylierbaren Polypeptids mindestens um den Faktor 2 gesteigert ist.  
25
6. Plasmid, dadurch gekennzeichnet, dass es sowohl ein *lipB*-Gen als auch ein Gen für ein lipoylierbares Polypeptid enthält.
7. Plasmid nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass es ein *lipB*-Gen sowie ein Gen, das für ein lipoylierbares Polypeptid codiert, jeweils unter Kontrolle eines Promotors trägt.  
30
8. Verfahren zur Herstellung einer Zelle gemäß Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass in eine Ausgangszelle ein Plasmid, das ein *lipB*-Gen enthält und ein Plasmid, das ein Gen für ein lipoylierbares Polypeptid enthält eingebracht werden, oder ein Plasmid gemäß Anspruch 6 oder 7 eingebracht wird.  
35

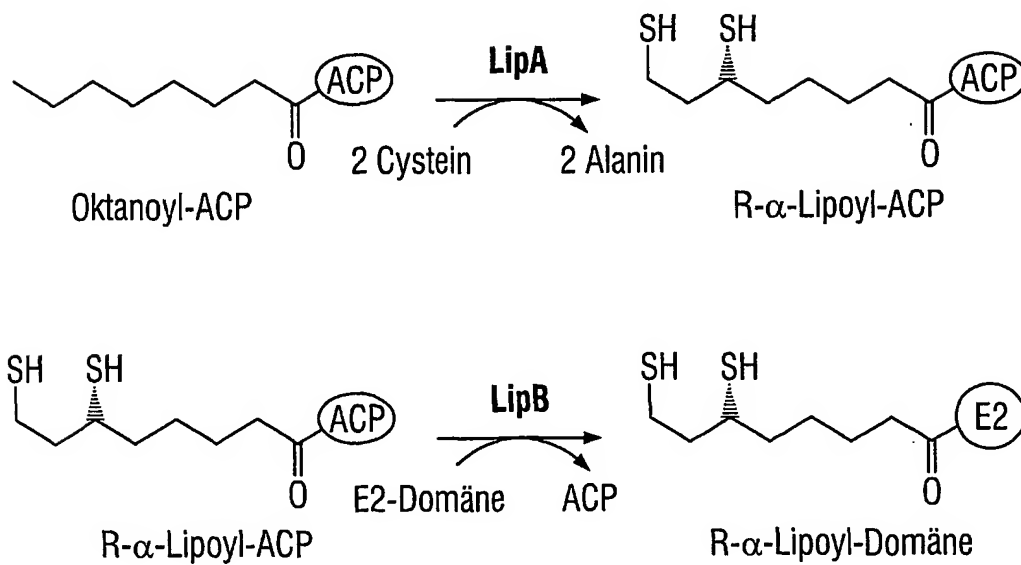
9. Verfahren zur fermentativen Herstellung von enantiomerenreiner R- $\alpha$ -Liponsäure, dadurch gekennzeichnet, dass eine Zelle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 in einem Kulturmedium kultiviert wird, wobei die Zelle enantiomerenreine R- $\alpha$ -Liponsäure in das Kulturmedium ausscheidet und die enantiomerenreine R- $\alpha$ -Liponsäure vom Kulturmedium abgetrennt wird.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Kultivierung der Zellen in einem Minimalsalzmedium erfolgt, wobei als Kohlenstoffquelle Asparaginsäure, Äpfelsäure, Bernsteinsäure, Brenztraubensäure, Fumarsäure, Glutaminsäure, Glucose, Glycerin oder Oxallessigsäure eingesetzt werden und Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C2-C8, bevorzugt mit einer Kettenlänge von C6-C8 (Hexan- bzw. Oktansäure) als spezifische Vorstufen für die  $\alpha$ -Liponsäure-Synthese dem Medium zugesetzt werden.



***Fig. 1:*** Schematische Darstellung des modularen Aufbaus der E2-Untereinheit (E2p) des PDH-Multienzymkomplexes von *Escherichia coli*

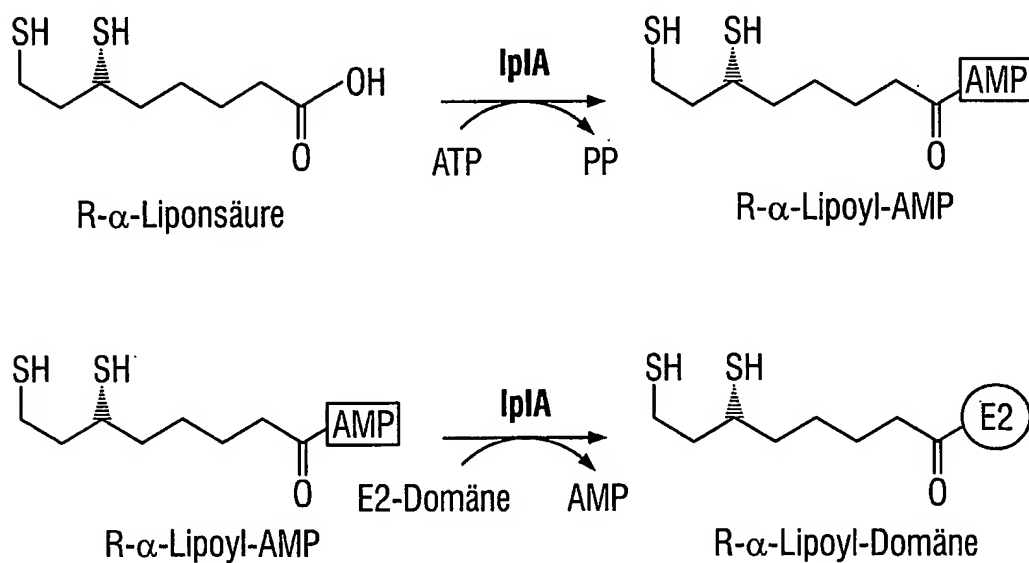


2 / 4

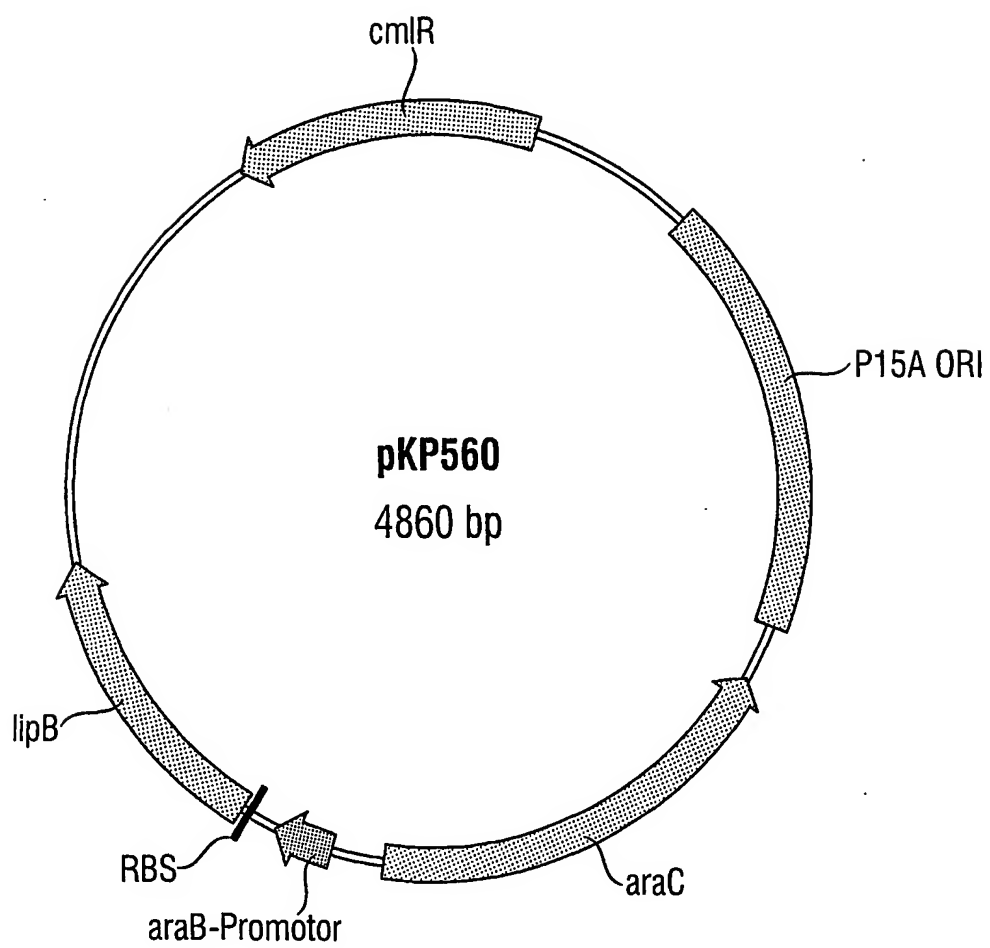
***Fig. 2:*** Synthese der R- $\alpha$ -Liponsäure in *E. coli*

3 / 4

***Fig. 3:*** Aktivierung und Einbau freier R- $\alpha$ -Liponsäure  
bei *E. coli* mittels der Lipoyl-Protein-Ligase A



***Fig. 4:*** Vektor pKP560



## SEQUENCE LISTING

<110> Consortium fuer elektrochemische Industrie GmbH

5 <120> Zellen und Verfahren zur fermentativen Herstellung von  
R-alpha-Liponsaeure

<130> Co10314

10 <140>  
<141>

<160> 4

15 <170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1  
<211> 679  
<212> DNA

20 <213> Escherichia coli

<220>  
<221> CDS  
<222> (16)..(654)

25 <223> lipB Gen

<300>  
<301> Reed, Kelynn E.  
Cronan Jr., John E.

30 <302> Lipoic Acid Metabolism in Escherichia coli: Sequencing  
and Functional Characterization of the lipA and lipB  
Genes

<303> J. Bacteriol.  
<304> 175

35 <305> 5  
<306> 1325-1336  
<307> 1993

<400> 1

40 cacggagatg cccat atg tat cag gat aaa att ctt gtc cgc cag ctc ggt 51  
Met Tyr Gln Asp Lys Ile Leu Val Arg Gln Leu Gly  
1 5 10

ctt cag cct tac gag cca atc tcc cag gct atg cat gaa ttc acc gat 99  
45 Leu Gln Pro Tyr Glu Pro Ile Ser Gln Ala Met His Glu Phe Thr Asp  
15 20 25

acc cgc gat gat agt acc ctt gat gaa atc tgg ctg gtc gag cac tat 147  
Thr Arg Asp Asp Ser Thr Leu Asp Glu Ile Trp Leu Val Glu His Tyr  
50 30 35 40

ccg gta ttc acc caa ggt cag gca gga aaa gcg gag cac att tta atg 195  
Pro Val Phe Thr Gln Gly Gln Ala Gly Lys Ala Glu His Ile Leu Met  
45 50 55 60

55

ccg ggt gat att ccg gtg atc cag agc gat cgc ggt ggg cag gtg act 243  
 Pro Gly Asp Ile Pro Val Ile Gln Ser Asp Arg Gly Gly Gln Val Thr  
 65 70 75

5 tat cac ggg ccg ggg caa cag gtg atg tat gtg ttg ctt aac ctg aaa 291  
 Tyr His Gly Pro Gly Gln Gln Val Met Tyr Val Leu Leu Asn Leu Lys  
 80 85 90

10 cgc cgt aaa ctc ggt gtg cgt gaa ctg gtg acc ttg ctt gag caa aca 339  
 Arg Arg Lys Leu Gly Val Arg Glu Leu Val Thr Leu Leu Glu Gln Thr  
 95 100 105

15 gtg gtg aat acc ctg gct gaa ctg ggt ata gaa gcg cat cct cgg gct 387  
 Val Val Asn Thr Leu Ala Glu Leu Gly Ile Glu Ala His Pro Arg Ala  
 110 115 120

20 gac gcg cca ggt gtc tat gtt ggg gaa aag aaa att tgc tca ctg ggt 435  
 Asp Ala Pro Gly Val Tyr Val Gly Glu Lys Lys Ile Cys Ser Leu Gly  
 125 130 135 140

tta cgt att cga cgc ggt tgt tca ttc cac ggt ctg gca tta aac gtc 483  
 Leu Arg Ile Arg Arg Gly Cys Ser Phe His Gly Leu Ala Leu Asn Val  
 145 150 155

25 aat atg gat ctt tca cca ttt tta cgt att aat cct tgt ggg tat gcc 531  
 Asn Met Asp Leu Ser Pro Phe Leu Arg Ile Asn Pro Cys Gly Tyr Ala  
 160 165 170

30 gga atg gaa atg gct aaa ata tca caa tgg aaa ccc gaa gcg acg act 579  
 Gly Met Glu Met Ala Lys Ile Ser Gln Trp Lys Pro Glu Ala Thr Thr  
 175 180 185

35 aat aat att gct cca cgt tta ctg gaa aat att tta gcg cta cta aac 627  
 Asn Asn Ile Ala Pro Arg Leu Leu Glu Asn Ile Leu Ala Leu Leu Asn  
 190 195 200

40 aat ccg gac ttc gaa tat att acc gct taattccata catcaatggc ccaat 679  
 Asn Pro Asp Phe Glu Tyr Ile Thr Ala  
 205 210

<210> 2  
 <211> 213  
 <212> PRT  
 45 <213> Escherichia coli

<400> 2  
 Met Tyr Gln Asp Lys Ile Leu Val Arg Gln Leu Gly Leu Gln Pro Tyr  
 1 5 10 15

50 Glu Pro Ile Ser Gln Ala Met His Glu Phe Thr Asp Thr Arg Asp Asp  
 20 25 30

55 Ser Thr Leu Asp Glu Ile Trp Leu Val Glu His Tyr Pro Val Phe Thr  
 35 40 45

Gln Gly Gln Ala Gly Lys Ala Glu His Ile Leu Met Pro Gly Asp Ile  
           50                          55                          60  
 5 Pro Val Ile Gln Ser Asp Arg Gly Gly Gln Val Thr Tyr His Gly Pro  
    65                          70                          75                          80  
 Gly Gln Gln Val Met Tyr Val Leu Leu Asn Leu Lys Arg Arg Lys Leu  
                           85                          90                          95  
 10 Gly Val Arg Glu Leu Val Thr Leu Leu Glu Gln Thr Val Val Asn Thr  
                           100                          105                          110  
 Leu Ala Glu Leu Gly Ile Glu Ala His Pro Arg Ala Asp Ala Pro Gly  
 15                          115                          120                          125  
 Val Tyr Val Gly Glu Lys Lys Ile Cys Ser Leu Gly Leu Arg Ile Arg  
           130                          135                          140  
 20 Arg Gly Cys Ser Phe His Gly Leu Ala Leu Asn Val Asn Met Asp Leu  
    145                          150                          155                          160  
 Ser Pro Phe Leu Arg Ile Asn Pro Cys Gly Tyr Ala Gly Met Glu Met  
    ,                          165                          170                          175  
 25 Ala Lys Ile Ser Gln Trp Lys Pro Glu Ala Thr Thr Asn Asn Ile Ala  
                           180                          185                          190  
 Pro Arg Leu Leu Glu Asn Ile Leu Ala Leu Leu Asn Asn Pro Asp Phe  
 30                          195                          200                          205  
 Glu Tyr Ile Thr Ala  
           210  
 35  
     <210> 3  
     <211> 261  
     <212> DNA  
     <213> Escherichia coli  
 40  
     <220>  
     <221> CDS  
     <222> (1)..(258)  
     <223> Hybridgen der E2-Domaene  
 45  
     <300>  
     <301> Miles, John S.  
           Guest, John R.  
     <302> Subgenes expressing single lipoyl domains of the  
 50          dehydrogenase complex of Escherichia coli  
     <303> Biochem. J.  
     <304> 245  
     <306> 869-874  
     <307> 1987  
 55

<300>  
 <301> Ali, Sohail T.  
 Guest, John R.  
 <302> Isolation and characterisation of lipoylated and  
 5 unlipoylated domains of the E2p subunit of the pyruvate  
 dehydrogenase complex of *Escherichia coli*  
 <303> Biochem. J.  
 <304> 271  
 <306> 139-145  
 10 <307> 1990  
  
 <400> 3  
 atg gct atc gaa atc aaa gta ccg gac atc ggg gct gat gaa gtt gaa 48  
 Met Ala Ile Glu Ile Lys Val Pro Asp Ile Gly Ala Asp Glu Val Glu  
 15 1 5 10 15  
  
 atc acc gag atc ctg gtc aaa gtg ggc gac aaa gtt gaa gcc gaa cag 96  
 Ile Thr Glu Ile Leu Val Lys Val Gly Asp Lys Val Glu Ala Glu Gln  
 20 20 25 30  
  
 20 tcg ctg atc acc gta gaa ggc gac aaa gct tct atg gaa gtt ccg gcg 144  
 Ser Leu Ile Thr Val Glu Gly Asp Lys Ala Ser Met Glu Val Pro Ala  
 35 40 45  
  
 25 ccg ttt gca ggc gtc gtg aag gaa ctg aaa gtc aac gtt ggc gat aaa 192  
 Pro Phe Ala Gly Val Val Lys Glu Leu Lys Val Asn Val Gly Asp Lys  
 50 55 60  
  
 gtg aaa act ggc tcg ctg att atg atc ttc gaa gtt gaa ggc gca gcg 240  
 30 Val Lys Thr Gly Ser Leu Ile Met Ile Phe Glu Val Glu Gly Ala Ala  
 65 70 75 80  
  
 cct gcg gca gct cct gcg taa 261  
 Pro Ala Ala Ala Pro Ala  
 35 85  
  
 <210> 4  
 <211> 86  
 40 <212> PRT  
 <213> *Escherichia coli*  
  
 <400> 4  
 Met Ala Ile Glu Ile Lys Val Pro Asp Ile Gly Ala Asp Glu Val Glu  
 45 1 5 10 15  
  
 Ile Thr Glu Ile Leu Val Lys Val Gly Asp Lys Val Glu Ala Glu Gln  
 20 25 30  
  
 50 Ser Leu Ile Thr Val Glu Gly Asp Lys Ala Ser Met Glu Val Pro Ala  
 35 40 45  
  
 Pro Phe Ala Gly Val Val Lys Glu Leu Lys Val Asn Val Gly Asp Lys  
 50 55 60  
 55



Val Lys Thr Gly Ser Leu Ile Met Ile Phe Glu Val Glu Gly Ala Ala  
 65 70 75 80  
 Pro Ala Ala Ala Pro Ala  
 5 85  
 <210> 5  
 <211> 264  
 10 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli  
 <220>  
 <221> CDS  
 15 <222> (1)..(261)  
 <223> Gen der BCCP-DASMEP-Domaene  
 <300>  
 <301> Reche, Pedro  
 20 Perham, Richard N.  
 <302> Structure and selectivity in post-translational  
 modification: attaching the biotinyl-lysine and  
 lipoyl-lysine swinging arms in multifunctional enzymes.  
 <303> EMBO J.  
 25 <304> 18  
 <305> 10  
 <306> 2673-2682  
 <307> 1999  
 30 <400> 5  
 atg gaa gcg cca gca gca gcg gaa atc agt ggt cac atc gta cgt tcc 48  
 Met Glu Ala Pro Ala Ala Ala Glu Ile Ser Gly His Ile Val Arg Ser  
 1 5 10 15  
 35 ccg atg gtt ggt act ttc tac cgc acc cca agc ccg gac gca aaa gct 96  
 Pro Met Val Gly Thr Phe Tyr Arg Thr Pro Ser Pro Asp Ala Lys Ala  
 20 25 30  
 ttc atc gaa gtg ggt cag aaa gtc aac gtg ggc gat acc cta tgc atc 144  
 40 Phe Ile Glu Val Gly Gln Lys Val Asn Val Gly Asp Thr Leu Cys Ile  
 35 40 45  
 gtt gaa gcc gac aaa gca tcg atg gaa atc ccg gcg gac aaa tcc ggt 192  
 Val Glu Ala Asp Lys Ala Ser Met Glu Ile Pro Ala Asp Lys Ser Gly  
 45 50 55 60  
 acc gtg aaa gca att ctg gtc gaa agt gga caa ccg gta gaa ttt gac 240  
 Thr Val Lys Ala Ile Leu Val Glu Ser Gly Gln Pro Val Glu Phe Asp  
 65 70 75 80  
 50 gag ccg ctg gtc gtc atc gag taa 264  
 Glu Pro Leu Val Val Ile Glu  
 85  
 55

<210> 6  
<211> 87  
<212> PRT  
<213> Escherichia coli

5

<400> 6  
Met Glu Ala Pro Ala Ala Ala Glu Ile Ser Gly His Ile Val Arg Ser  
1 5 10 15

10 Pro Met Val Gly Thr Phe Tyr Arg Thr Pro Ser Pro Asp Ala Lys Ala  
20 25 30

Phe Ile Glu Val Gly Gln Lys Val Asn Val Gly Asp Thr Leu Cys Ile  
35 40 45

15

Val Glu Ala Asp Lys Ala Ser Met Glu Ile Pro Ala Asp Lys Ser Gly  
50 55 60

20 Thr Val Lys Ala Ile Leu Val Glu Ser Gly Gln Pro Val Glu Phe Asp  
65 70 75 80

Glu Pro Leu Val Val Ile Glu  
85

25

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PC1/EP2004/007487

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07D339/04 C12N1/21 C12N15/63 C12P7/42 C12P11/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ, Sequence Search, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JORDAN S W ET AL: "The Escherichia coli lipB gene encodes lipoyl (octanoyl)-acyl carrier protein:protein transferase" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 185, no. 5, March 2003 (2003-03), pages 1582-1589, XP002268662 ISSN: 0021-9193 the whole document ----- -/--	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the International filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

26 October 2004

Date of mailing of the International search report

08/11/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Morawetz, R

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2004/007487

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>VAISVILA R ET AL: "The LipB protein is a negative regulator of dam gene expression in Escherichia coli"</p> <p>BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA . GENE STRUCTURE AND EXPRESSION, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1494, no. 1-2, 15 November 2000 (2000-11-15), pages 43-53, XP004275790</p> <p>ISSN: 0167-4781</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	1-10
Y	<p>JORDAN SEAN W ET AL: "Chromosomal amplification of the Escherichia coli lipB region confers high-level resistance to selenolipoic acid"</p> <p>JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 184, no. 19, October 2002 (2002-10), pages 5495-5501, XP002302397</p> <p>ISSN: 0021-9193</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	1-10
Y	<p>MORRIS T W ET AL: "Lipoic Acid Metabolism in Escherichia coli: The lipA and lipB Genes Define Redundant Pathways for Ligation of Lipoyl Groups to Apoprotein"</p> <p>JOURNAL OF BACTERIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 177, no. 1, January 1995 (1995-01), pages 1-10, XP002268660</p> <p>ISSN: 0021-9193</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	1-10
Y	<p>REED K E ET AL: "LIPOIC ACID METABOLISM IN ESCHERICHIA COLI: SEQUENCING AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF LIP A AND LIP B GENES"</p> <p>JOURNAL OF BACTERIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 175, no. 5, March 1993 (1993-03), pages 1325-1336, XP008025890</p> <p>ISSN: 0021-9193</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	1-10
P,Y	<p>WO 2004/044211 A (DASSLER TOBIAS ; CONSORTIUM ELEKTROCHEM IND (DE))</p> <p>27 May 2004 (2004-05-27)</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	1-10
P,Y	<p>WO 2004/053131 A (DASSLER TOBIAS ; CONSORTIUM ELEKTROCHEM IND (DE))</p> <p>24 June 2004 (2004-06-24)</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	1-10

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2004/007487

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004044211 A	27-05-2004	DE 10245993 A1 WO 2004044211 A1	06-05-2004 27-05-2004
WO 2004053131 A	24-06-2004	DE 10258127 A1 WO 2004053131 A1	08-07-2004 24-06-2004